

## 遺伝子工学的手法による耐冷性イネの作出

著者	横井 修司
号	556
発行年	1997
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15980">http://hdl.handle.net/10097/15980</a>

氏 名(本籍)	横 <sup>よこ</sup> 井 <sup>い</sup> 修 <sup>しゅう</sup> 司 <sup>じ</sup>
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 5 5 6 号
学位授与年月日	平 成 10 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	遺伝子工学的手法による耐冷性イネの作出

論文審査委員	(主 査) 教 授 西 尾 剛
	教 授 亀 谷 壽 昭
	教 授 西 山 岩 男

# 論文内容要旨

## 緒言

イネは、幼苗期（活着期）と小胞子期初期に低温障害を受けやすい事が問題となっている。特に、小胞子期初期に低温（19℃以下）に曝されると葯（特にタペート細胞）が傷害を受け、花粉が発育不良となって受精が起こらず、稔実不稔となる。将来の世界人口増加に対応して、食糧増産の必要性が高まることが予想され、この冷害対策は、稲作生産の安定・収穫量の確保の為に重要な問題になっている。

一方、耐冷性の強い植物（シロイヌナズナ・ホウレンソウ等）は、葉緑体膜の脂肪酸の主要組成成分であるフォスファチジルグリセロール（PG）の不飽和度が高いことが知られている。耐冷性の強いシロイヌナズナから単離した脂肪酸不飽和化に関連する酵素をコードする遺伝子（グリセロール三リン酸アシル基転移酵素：GPAT）をタバコに導入すると、不飽和脂肪酸含量が増加して耐冷性が付与されることが、形質転換タバコを用いた実験によって示されている。

本研究では、脂肪酸不飽和化に関連する遺伝子を導入することにより、幼苗期および障害型冷害耐性イネの作出を目的とした。そのために、はじめにイネへのアグロバクテリウムによる遺伝子導入法を開発し（第1章）、次に葯のタペート細胞で遺伝子を発現させる為のプロモーターの発現誘導解析を行った（第2章）。次に葯のタペート細胞で発現誘導することを明らかにしたプロモーター（*Osg6B*）およびイネの全身で発現誘導することが知られているユビキチンプロモーターの下流にシロイヌナズナからクローニングされたGPAT 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を、アグロバクテリウム法によってイネに遺伝子導入し、脂肪酸組成の変化および幼苗期と花粉形成期の低温耐性を調査した（第3章）。

## 第1章 アグロバクテリウム法によるイネへの遺伝子導入

アグロバクテリウムを用いた高等植物の形質転換は、主に双子葉植物に用いられ、高率で再現性のよい方法である。しかし、従来イネには適用できないとされてきた。本研究では、イネにおけるアグロバクテリウムによる遺伝子導入法について検討した。本研究で確立した遺伝子導入法をFig. 1-1に示した。重要なポイントとして、誘導3週間目の胚盤由来カルスを供試材料に用いること（Fig. 1-1 A）、アグロバクテリウムの系統には通常市販のベクターを持つEHA101を用いること（Fig. 1-1 B）、アグロバクテリウムの懸濁液にはAA培地を用いること（Fig. 1-1 C）、共存培養培地には

アセトシリングンを添加すること (Fig. 1-1 D)、選抜マーカーにはハイグロマイシンを用いること (Fig. 1-1 F) が挙げられる。この方法を用い、カルスを再分化培地に置床すると3~5週間で再分化個体を得られた (Fig. 1-1 G)。再分化個体は正常に生育し (Fig. 1-1, H)、種子稔性も95%と wild type と同様の種子稔性を示した。形質転換効率はヤマハウシで25.7%、日本晴で10.6%であった (Table 1-1)。得られた形質転換イネの自殖後代について外来遺伝子の遺伝性を調査したところ、期待値通りの分離を示し、メンデル遺伝の法則にしたがって後代に遺伝していることが確認された (Table 1-2)。

アグロバクテリウムを用いたイネへの遺伝子導入法は1994年に初めて報告された (Hiei *et al.* 1994)。本研究では再現性を確認するとともにベクターの特殊性がないこと、操作・培地の単純化という点で、既報の方法をより簡便化することに成功した。

## 第2章 イネ葯特異的プロモーターの発現誘導解析

障害型冷害耐性イネの作出のためのプロモーターの検討を目的として、イネからタベート細胞特異的遺伝子として単離された *Osg6B* のプロモーターの発現誘導解析を行った。このプロモーターの下流に  $\beta$ -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を連結した *Osg6B* :: *GUS* ベクターを構築し、第1章で確立したアグロバクテリウム法によってイネに遺伝子導入した (形質転換効率: 15.3%)。形質転換イネの葯における *GUS* 遺伝子の発現を組織化学的に検出してプロモーター活性を調査した。その結果、*Osg6B* プロモーターは形質転換イネの小孢子期のタベート細胞特異的に発現誘導していることが分かった (Fig. 2-1)。また、蛍光試薬を用いて *GUS* 発現を定量したところ、*Osg6B* プロモーターは花粉のステージで1核期中期から発現誘導を開始し、花粉の発育段階をおって発現が強くなり、開花3日前まで発現が認められた (Fig. 2-2)。以上のことから、イネの障害型冷害の危険期に、しかも傷害部位である小孢子期初期のタベート細胞で発現が認められるため、このプロモーターが障害型冷害耐性イネの作出に使用可能なプロモーター候補であると判断した。

## 第3章 GPAT 遺伝子を導入した形質転換イネの解析

脂肪酸組成を変化させた形質転換イネについて耐冷性の評価を行うため、前述の

*Osg6B* プロモーターとイネの全身で発現誘導するトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターの各々の下流にシロイヌナズナから単離されたGPAT 遺伝子を連結したキメラ遺伝子 (*Osg6B :: GPAT* および *Ubiquitin :: GPAT*) を構築し (Fig. 3-1)、ヤマホウシに遺伝子導入を行った。*Ubiquitin :: GPAT* 遺伝子の場合、得られた形質転換当代 (T0世代) と自殖次代 (T1) で次の実験を行った。尚、T1世代では導入遺伝子の分離が見られるため、導入遺伝子を持つ個体 (+ GPAT gene) と持たない個体 (- GPAT gene) を区別して調査した。

#### (1) 脂肪酸組成の変化

*Ubiquitin :: GPAT* 形質転換イネの葉の葉緑体膜における脂肪酸組成を分析した結果、形質転換イネは、全脂質における主要7つの脂質クラス (MGDG, DGDG, SQDG, PG, PC, PE, PI) の割合に野生型との間に変化は認められなかった (Table 3-1)。さらにフォスファチジルグリセロール (PG) 画分内での分子種の割合を解析したところ、形質転換イネにおいて、飽和脂肪酸含量が野生型よりも20%低かった (Table 3-2)。このことから、GPAT 遺伝子の発現は、全脂質における各脂質クラスの割合は変化させず、フォスファチジルグリセロールの飽和脂肪酸含量を特異的に減少させ、不飽和脂肪酸含量を増加させる事が示された。葯は微量であるために葯における脂肪酸組成の分析ができなかったが、*Osg6B :: GPAT* 形質転換イネおよび *Ubiquitin :: GPAT* 形質転換イネの葯においてGPAT 遺伝子の発現をウェスタンブロットにより確認している (Fig. 3-2)。

#### (2) 幼苗期の耐冷性の評価

*Ubiquitin :: GPAT* 形質転換イネを用いて幼苗期の葉における光合成能力を酸素電極法により酸素放出量を指標として検定した。同一サンプルの葉を25℃・17℃・11℃の3点で測定したところ、25℃および11℃においては、差は認められなかった

(Fig. 3-3)。17℃においてGPAT 遺伝子を持つ *Ubiquitin :: GPAT* 形質転換イネ (+ GPAT gene) は、原品種 (WT) やGPAT 遺伝子を持たない形質転換イネ (- GPAT gene) よりも20%高い光合成能力を維持していた (Fig. 3-3)。このことから、GPAT 遺伝子の導入によって生じる葉における不飽和脂肪酸含量の増加が、17℃での高い光合成能力維持をもたらしたことが示された。

#### (3) 花粉形成期の耐冷性の評価

*Osg6B :: GPAT* および *Ubiquitin :: GPAT* の2系統について障害型冷害耐性を閉鎖系

温室内で深水冷水浸漬法（水深 20cm、出穂前3週間処理、23℃および19℃）によって検定した。19℃条件下では障害型冷害耐性極強のコシヒカリは90%以上の花粉稔性を示すが、障害型冷害耐性弱のヤマホウシは50%以下の花粉稔性しか示さない事を予備実験で確認した。

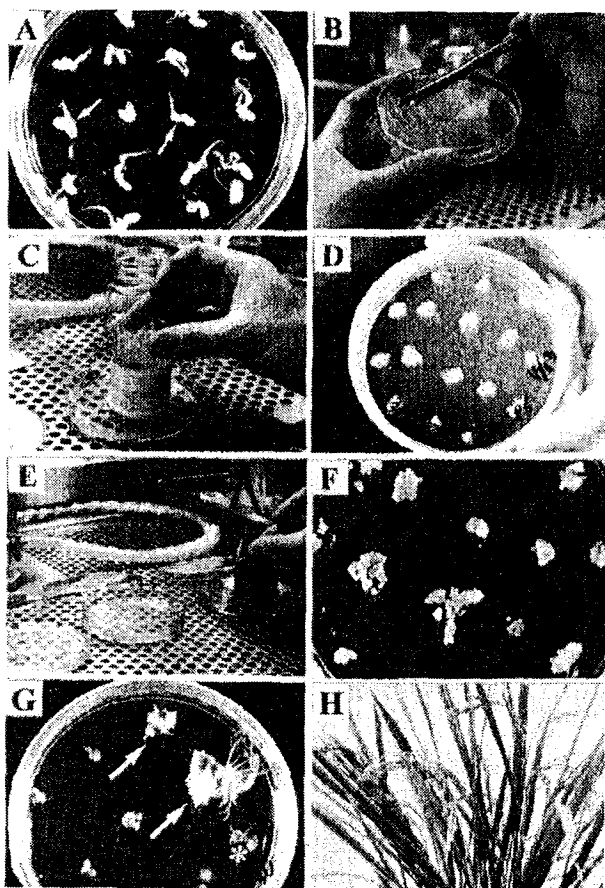
冷水浸漬処理後、花粉稔性を調査した結果、常温区・23℃区では系統間に差異は認められなかったが、19℃区の場合に、原品種（WT）や*GPAT* 遺伝子を発現していない個体（- *GPAT* gene）では蒴が小さくなってねじれ、花粉を殆ど作っていない様子が観察され、稔性の高い個体は得られなかった。一方、*Ubiquitin :: GPAT* 形質転換イネ（+ *GPAT* gene）においては、80%前後の高い花粉稔性をもつ個体が4個体得られた（Fig. 3-4）。また、これらの個体の種子稔性を調査したところ、花粉稔性の高かった4個体の+ *GPAT* gene 個体では80%程度の種子稔性を示したが、コシヒカリを除く他の個体では25%以下の種子稔性しか示さなかった（Table 3-3）。このことにより、*GPAT* 遺伝子を導入することにより、耐冷性を付与できることが明らかになった。また、本研究の検定法では、プロモーターとして*Osg6* プロモーターよりもユビキチンプロモーターの方が適していることを明らかにした。

## 結語

ユビキチンプロモーターに*GPAT* 遺伝子を連結したキメラ遺伝子をアグロバクテリウム法によりイネに遺伝子導入することにより、葉緑体膜のPGの不飽和脂肪酸含量を増加させることに成功した。この形質転換イネは幼苗期の低温下（17℃）で高い光合成能を維持しており、さらに障害型冷害耐性を有することがわかった。

本研究の結果から、PGの不飽和度がイネの耐冷性に関与しており、その改変によって低温耐性を制御できる可能性が示された。脂肪酸不飽和化に関連する遺伝子を導入し、脂肪酸不飽和度の改変によって低温耐性を付与した研究はラン藻・タバコ・シロイヌナズナを用いた研究でなされているが、主要農作物であるイネにおいてPGの脂肪酸組成を改変して耐冷性を付与した研究は、本研究が初めてである。

本研究で用いた*GPAT* 遺伝子以外にも様々な脂肪酸不飽和化に関連する遺伝子を導入すれば、更に強力な耐冷性をイネに付与できることが期待される。



**Fig. 1-1** Transformation of rice (*Oryza sativa* L. cv. Yamahoushi ) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

(A) Three-week-old scutellum derived calli (3-4 mm in diameter) on N6 callus induction medium, Compact calli (arrows) were separated with scalpel and were used for transformation.

(B) *Agrobacterium* was cultured on AB medium and collected with a small spoon.

(C) Scutellum derived calli were put into wide mouth tube having 30 µm nylon filter and were immersed in the *Agrobacterium* suspension in AA suspension medium for a few minutes (1.5 - 2 min.).

(D) Infected scutellum calli were covered with a thin layer of *Agrobacterium* on N6 co-culture medium after 3 days of co-cultivation.

(E) The infected calli were washed three times with sterile water supplemented with 500 mg/l carbenicillin to kill the *Agrobacterium*.

(F) The infected calli were placed on N6 selection medium which contained 50 mg/l hygromycin and 500 mg/l carbenicillin. Some of the calli turned brown, but shoot formation was also achieved from these calli.

(G) Plant regeneration on an MS regeneration medium which contained hygromycin. Arrows indicate regenerated plants. Astarisc indicates that shoot formation from calli that looked dead.

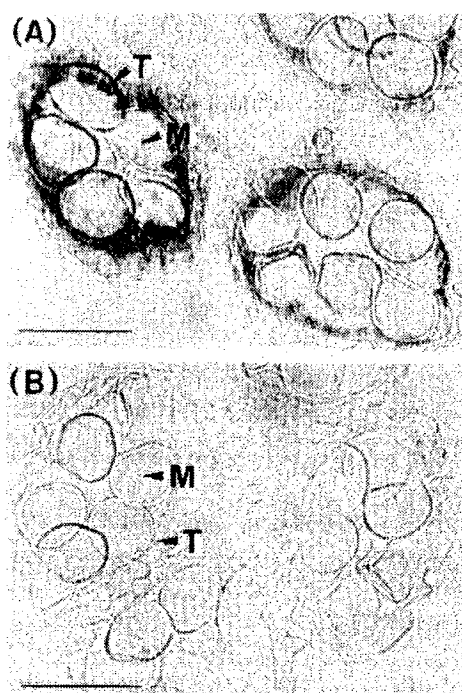
(H) Transgenic plants grown in a greenhouse.

**Table 1-1** Efficiency of rice transformation

Cultivar	Number of scutellum-derived calli		Frequency (b/a, %)
	Inoculated (a)	Produced HygR plants (b)	
Yamahoushi	144	37	25.7
Nipponbare	169	16	10.6

**Table 1-2** Genetic segregation of hygromycin resistance (Hyg<sup>R</sup>) and sensitive (Hyg<sup>S</sup>) in selfed progeny (T<sub>1</sub>) of transgenic rice.

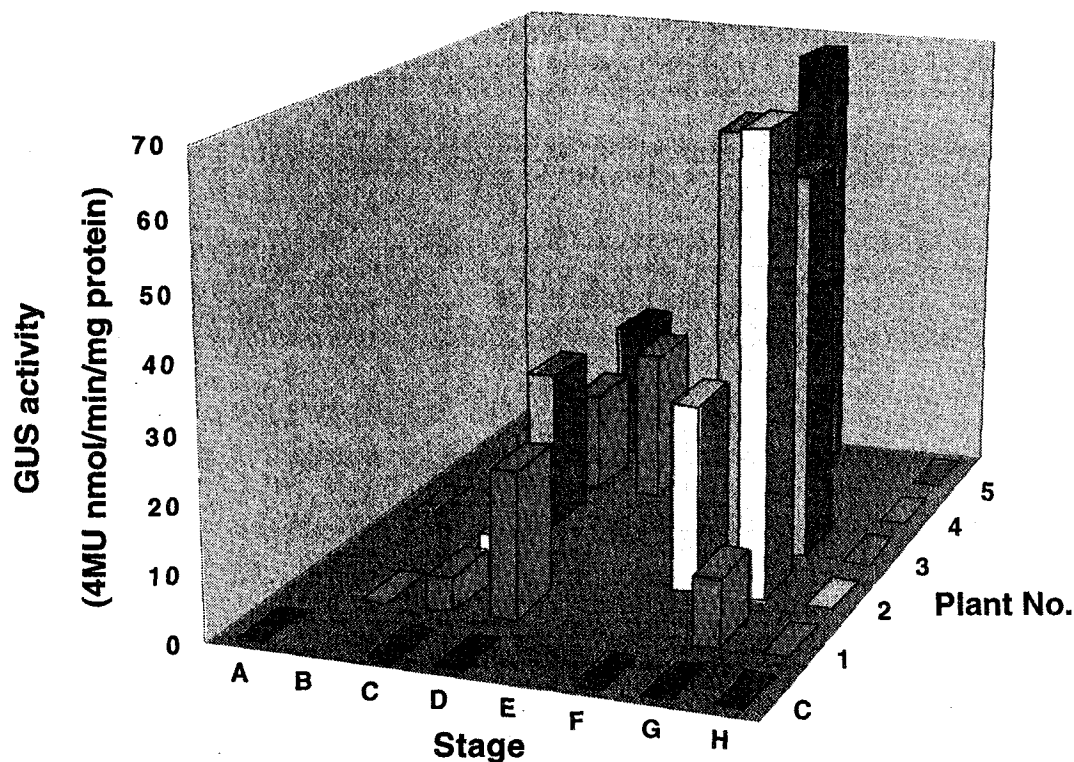
Plant No.	Total T <sub>1</sub> seedlings tested	Hyg <sup>R</sup> : Hyg <sup>S</sup>	Expected ratio	P value
3	48	34 : 14	3 : 1	0.505
8-3	48	47 : 1	15 : 1	0.233
10	48	38 : 10	3 : 1	0.505
11-2	48	33 : 15	3 : 1	0.317
12-8	48	37 : 11	3 : 1	0.739



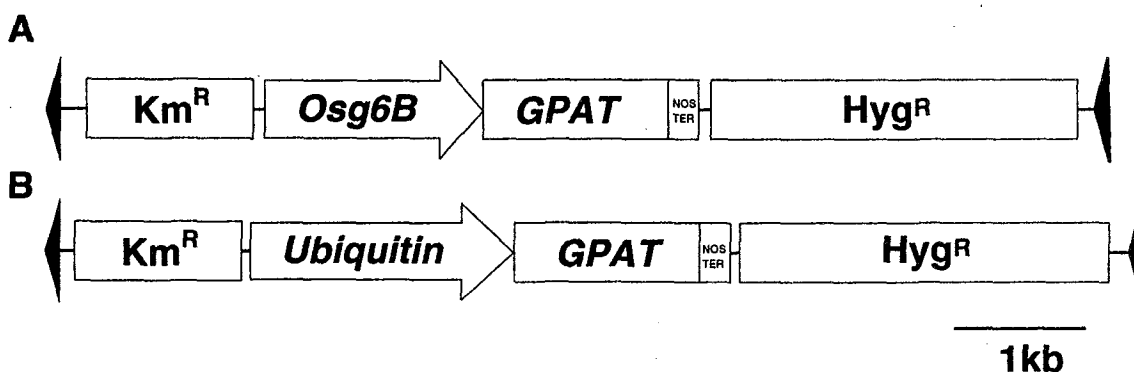
**Fig. 2-1** Histochemical analysis of GUS activity in anthers. (A) mid-dle bicellular pollen stage in the transgenic plant. (B) middle bicellular pollen stage in the untransformed plant.

Bar =50  $\mu$ m





**Fig. 2-2** Fluorometrical analysis of GUS activity in the anthers of five transgenic plants (1 to 5) and an untransgenic plant (C). Stages; A, meiotic stage; B, middle uninucleate microspore stage; C, late uninucleate microspore stage; D, early bicellular pollen stage; E, middle bicellular pollen stage; F, late bicellular pollen stage; G, early tricellular pollen stage; H, mature pollen stage



**Fig. 3-1** T-DNA region of vectors for plant transformation. A; *Osg6B* :: *GPAT*. *Km<sup>R</sup>*; gene for kanamycin resistance, *Osg6B*; tapetum-specific promoter, *GPAT*; cDNA for glycerol-3-phosphate acyltransferase from *A. thaliana*, NOS-TER; 3' signals of nopaline synthase, *Hyg<sup>R</sup>*, gene for hygromycin resistance. B; *Ubiquitin* :: *GPAT*. *Km<sup>R</sup>* gene for kanamycin resistance, *Ubiquitin*; *Ubiquitin* promoter from maize, *GPAT*; cDNA for glycerol-3-phosphate acyltransferase from *A. thaliana*, NOS-TER; 3' signals of nopaline synthase, *Hyg<sup>R</sup>*, gene for hygromycin resistance

**Table 3-1** Composition (mol percent) of membrane lipids from leaves of rice plants.

Plant No.	Expression	MGDM	DGDG	SQDG	PG	PC	PE	PI
T0 generation								
No.1	+	53	27	6	6	3	2	3
Wild type	—	54	28	6	4	4	3	2
T1 generation								
No.1-1	+	44	28	8	8	6	4	2
No.1-2	—	47	28	7	7	4	3	2
No.1-4	+	44	30	7	10	4	2	3
No.1-5	+	46	27	7	10	5	3	3
No.1-6	+	45	28	8	10	4	2	3
No.1-7	+	43	28	8	10	5	3	2
No.1-8	+	47	26	10	13	1	1	3
Wild type-1	—	47	29	7	7	5	3	2
Wild type-2	—	50	26	7	7	5	3	2

MGDM, monogalactosyldiacylglycerol; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; SQDG, sulphoquinovosyldiacylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol  
No.1, Transformant; W, Wild Type; No. 1-1, 1-2, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 and 1-8 were progeny of No.1.

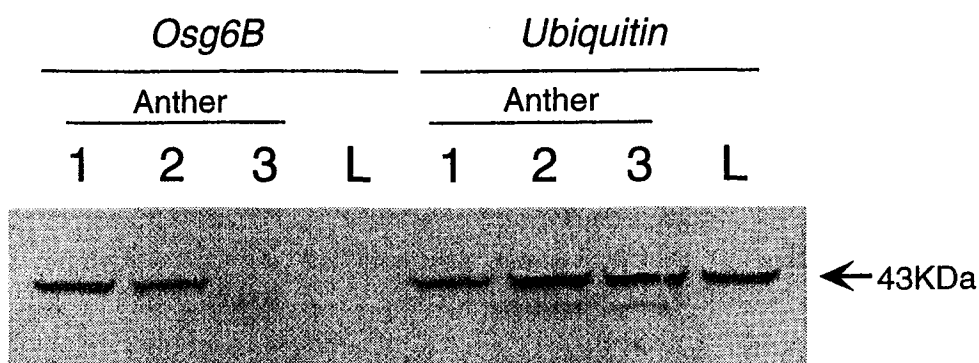
**Table 3-2** The fatty acid composition (mol percent) of phosphatidylglycerol from rice leaves.

Plant No.	Expression	16:0	16:1(t)	18:0	18:1	18:2	18:3	Sat(%) <sup>a</sup>
T0 generation								
No.1	+	24	41	2	9	17	7	30
Wild type	—	32	40	2	6	11	9	45
T1 generation								
No.1-1	+	28	35	3	5	13	16	26
No.1-2	—	36	36	2	4	9	13	45
No.1-3	+	23	39	3	7	12	15	24
No.1-4	+	25	39	2	7	11	16	28
No.1-5	+	24	40	2	5	11	17	29
No.1-6	+	22	40	2	7	13	16	25
No.1-7	+	22	40	2	6	12	17	24
No.1-8	+	22	40	2	6	12	18	23
Wild type-1	—	34	36	2	5	11	13	40
Wild type-2	—	34	37	2	4	9	14	42

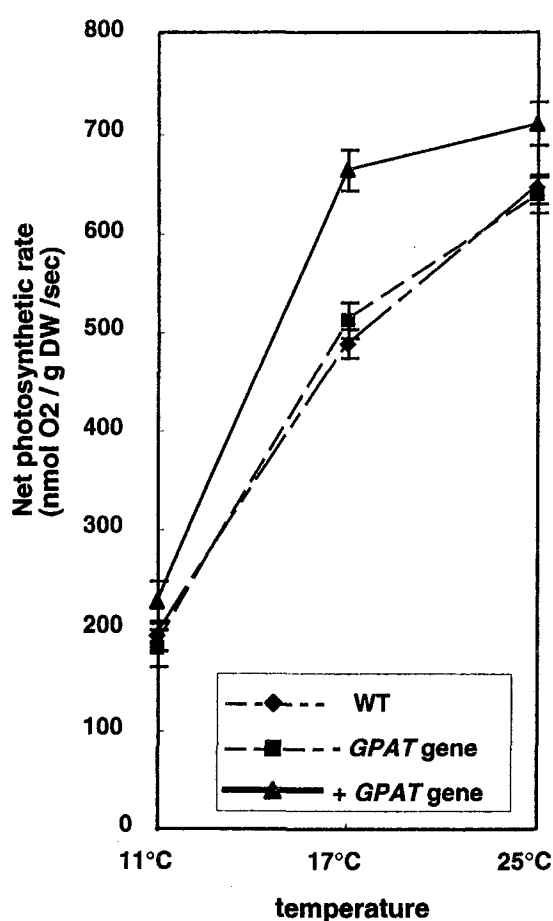
16:0, hexadecanoic acid (palmitic acid); 16:1t,  $\Delta^3$ -trans-hexadecenoic acid; 18:0, octadecanoic acid (stearic acid)  
18:1,  $\Delta^9$ -octadecenoic acid (oleic acid); 18:2,  $\Delta^9,12$ -octadecadienoic acid (linoleic acid) 18:3,  $\Delta^9,12,15$ -octadecatrienoic acid( $\alpha$ -linoleic acid)

a, Sum of saturated fatty acids.

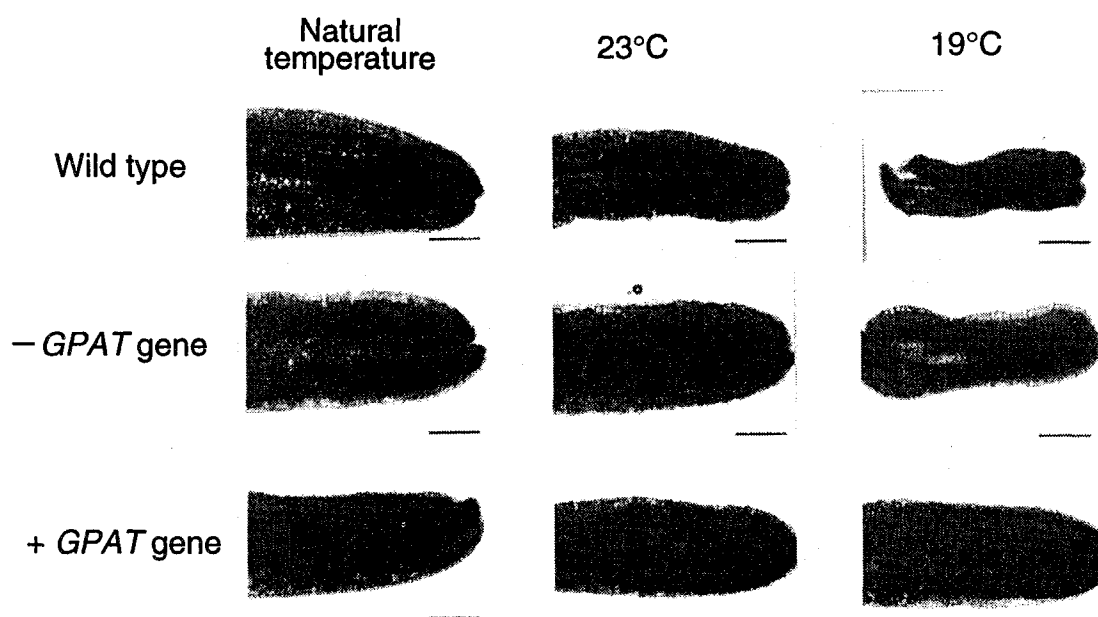
No.1, Transformant; plant No. 1-1 to 1-8 were progeny of No.1.



**Fig. 3-2** Detection of GPAT protein in anthers and leaves of *Osg6B::GPAT* and *Ubiquitin::GPAT* by Western blotting. 1, uninucleate microspore stage; 2, bicellular pollen stage; 3, tricellular pollen stage; L, leaf



**Fig. 3-3** Effects of low-temperature on the net photosynthetic rate of leaves of Wild type(◆:WT) and segregating progenies of transgenic rice with *GPAT* gene(▲:+ *GPAT* gene) and without *GPAT* gene (■:- *GPAT* gene). Values are the mean± standard error of five independent plants.



**Fig. 3-4** The shape of anther in wild type, transformant without *GPAT* (- *GPAT* gene) and transformant with *GPAT* (+ *GPAT* gene) after temperature treatment.  
Bar = 100  $\mu$ m

**Table 3-3** Estimation of chilling tolerance by cool water (19°C) irrigation.

Plants	Number of plants						Total number of plants
	Percentage of seed fertility						
	0 - 20 %	21 - 40 %	41 - 60 %	61 - 75 %	76 - 80 %	81 % -	
<i>Osg6B :: GPAT</i> cv. Yamahoushi	28	32	0	0	0	0	60
<i>Ubiquitin :: GPAT</i> cv. Yamahoushi (- <i>GPAT</i> gene)	8	6	0	0	0	0	14
<i>Ubiquitin :: GPAT</i> cv. Yamahoushi (+ <i>GPAT</i> gene)	5	7	0	0	2	2	16
Wild type cv. Koshihikari	0	0	0	0	0	10	10
Wild type cv. Yamahoushi	12	8	0	0	0	0	20

## 論文審査結果要旨

シロイヌナズナから単離された耐寒性に関与することが示されているグリセロール三リン酸アシル基転位酵素の遺伝子 (GPAT) をイネに導入することにより、耐冷性が強化できるかどうかを明らかにするため、イネの形質転換法の開発、必要なプロモーターの解析、GPAT 遺伝子を導入したイネの耐冷性の評価を行った。

単子葉植物は一般にアグロバクテリウムの宿主とならないことから、イネの形質転換は、直接導入法により行われてきた。しかし、直接導入法は形質転換効率が低いなどの問題があった。スーパーバイナリーベクターを用いたアグロバクテリウムによる形質転換法が Hiei ら (1994) により開発されたので、その方法の改良を試み、簡便で再現性が高く、特殊なベクターを必要としないため広く利用できる方法を確立した。

傷害型冷害は、減数分裂期から小胞子期において葯が低温障害を受けることによって起こることから、この時期に葯で特異的に発現誘導するプロモーターを見いだす目的で、Osg6B プロモーターの発現誘導解析を行った。Osg6B プロモーターに  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子をつないだキメラ遺伝子をイネに導入し、 $\beta$ -グルクロニダーゼの活性を調べたところ、酵素活性は形質転換イネの小胞子期のタペート細胞で特異的に見られた。

GPAT 遺伝子をイネの全身で発現誘導するユビキチンプロモーター又は Osg6B プロモーターの下流につないだキメラ遺伝子をイネに導入した。ユビキチンプロモーター GPAT 遺伝子導入植物では、葉のフォスファチジルグリセロールの飽和脂肪酸含量が非形質転換体より 20% 低く、低温条件である 17℃ での光合成能力が非形質転換体より有意に高かった。深水冷水浸漬法で出穂前 3 週間 19℃ の処理を行ったところ、Osg6B プロモーター GPAT 遺伝子導入イネでは葯が萎縮して不稔となったが、ユビキチンプロモーター GPAT 遺伝子導入植物の後代で同条件で稔性の高い植物が得られたことから、GPAT 遺伝子をイネの全身で発現させることによってイネに耐冷性を付与出来ることが明らかとなった。

以上のように本研究は、新たに簡易で効率の高いイネの形質転換技術を確立すると共に GPAT 遺伝子を導入することによりイネの耐冷性を強化できることを初めて明らかにした。よって審査員一同は本論文は博士 (農学) の学位を授与するに値する内容であると判定した。